

リンパ脈管筋腫症患者の肺組織からのリンパ管内皮細胞の分離・初代培養と細胞生物学的特徴の解析

研究分担者 瀬山邦明

順天堂大学大学院医学研究科 呼吸器内科学 教授

研究要旨

リンパ脈管筋腫症（LAM）の肺組織中の病巣は平滑筋細胞様の形態を示す LAM 細胞の増殖と豊富なリンパ管により特徴付けられる。この病理組織学的特徴は、LAM 細胞の増殖に伴いリンパ管新生が誘導され、LAM 細胞が産生・分泌するリンパ管内皮細胞増殖因子である VEGF-D が深く関与していると考えら得ているが、その詳細なメカニズムや LAM 病巣内で増殖しているリンパ管内皮細胞（LEC）の特徴は不明なままである。本研究では、LAM 肺組織と正常肺組織から FACS (fluorescence-activated cell sorting)により LECs を分離後、初代培養系を確立し、その特徴を明らかにすることを旨とした。LAM 肺組織から分離した LECs(以後、LAM-LEC)は正常肺から分離した LECs(control LEC)に比べ、増殖能や遊走能が亢進していた。VEGF-D を培養系に添加すると、LEC の遊走能は亢進したが、増殖能には影響しなかった。LAM-LEC と control LEC のマイクロアレイ解析で遺伝子発現を網羅的に解析し比較すると、LAM-LEC では VEGFR-3 と integrin $\alpha 9$ の発現が亢進している事が明らかとなった。VEGFR-3 阻害薬を培養系に添加すると LEC の増殖と遊走の両者が阻害されたが、integrin $\alpha 9$ を抗 integrin $\alpha 9$ 抗体で阻害すると VEGF-D を介した遊走能のみが抑制された。これらの結果から、LAM 病巣中の LEC は VEGFR-3 と integrin $\alpha 9$ の発現を増強させ、LAM 細胞から産生される VEGF-D 刺激を受け、VEGF-D/VEGFR-3 シグナル伝達と VEGF-D/ integrin $\alpha 9$ シグナル伝達の両者を介しリンパ管新生が誘導されていることが示唆された。

共同研究者：

西野宏一、吉松康裕、村松智輝、関本康人、三谷恵子、小林悦子、岡本翔一、江花弘基、岡田克典、栗原正利、鈴木健司、稲沢譲治、高橋和久、渡部徹郎

A. 研究目的

LAM 病巣を特徴付けるリンパ管新生のメカニズムを明らかにするため、LAM 病巣中のリンパ管内皮細胞 (LAM-LEC)を分離し、初代培養系を確立する。得られた LAM-LEC の細胞生物学的特徴を明らかにし、LAM 細胞によって誘導されるリンパ管新生のメカニズムを明らかにする。

B. 研究方法

肺移植時に摘出される LAM 肺の一部、LAM の気胸発症時や診断目的の生検時の肺組織の一部を用い、LEC を分離培養した。具体的には、肺組織を蛋白分解酵素で消化して肺構成細胞浮遊液を調整し、FACS (fluorescence-activated cell sorting)により CD31+/podoplanin+ の LEC (LAM-LEC) を分離し、内皮細胞系培養液 ECBM/5%FBS で初代培養する系を確立した。一方、肺癌手術時に摘出された肺組織の非癌部を正常対照とし、同様の方法により正常肺組織由来の LEC (control LEC) とした。

C. 研究結果

初代培養系で LAM-LEC は control LEC に比して高い増殖能を示した。LEC の培養系に内皮細胞増殖因子である VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D を添加して増殖反応を検討したが、LAM-LEC、control LEC に差を

認めなかった。興味深いことに VEGF-A が最も強い増殖促進作用を示した。LECs の遊走能を検討したところ、無刺激の状態では LAM-LECs は control LECs に比して高い遊走能を示した。遊走能に対する VEGF-A、VEGF-C、VEGF-D の効果を検討したところ、VEGF-C が最も強く遊走を亢進させ、次いで VEGF-D と-A はほぼ動揺であった。増殖因子添加に対する反応は LAM-LEC、control LECs に差を認めなかった。

LAM-LECs と control LECs のマイクロアレイ解析で遺伝子発現を網羅的に検討し、GSEA (gene set enrichment analysis) を行ったところ、LAM-LECs において GO term の LEC-specific genes, endothelial cell proliferation, endothelial cell migration に含まれる遺伝子群の発現が亢進していた。この中で VEGF-D のシグナル伝達に重要な VEGFR-3 と integrin $\alpha 9$ の発現が亢進していることに着目して解析した。ところ、比較すると、LAM-LECs では VEGFR-3 と integrin $\alpha 9$ の発現が亢進している事が明らかとなった。VEGFR-3 のシグナル伝達阻害剤の MAZ51 と添加すると LAM-LECs の増殖が抑制されたが、抗 integrin $\alpha 9$ 抗体の添加では抑制されなかった。VEGF-A と-C 添加による増殖能亢進は MAZ51 で抑制されたが抗 integrin $\alpha 9$ 抗体では抑制されなかった。VEGF-C と-DNA 添加による遊走能亢進は MAZ51 で抑制されたが、抗 integrin $\alpha 9$ 抗体の添加では VEGF-D による遊走能亢進のみが抑制された。

D. 考察

LAM 細胞は VEGF-D を産生・分泌するため、VEGF-D /VEGFR-3 シグナル伝達系が重要であることが考えられていたが、LAM-LECs では VEGFR-3 発現が亢進しており、この経路の病態における重要性が実際に明らかになった。増殖に関しては従来考えられていたよりも VEGF-D の役割は低く VEGF-A や-C の役割が大きく、VEGFR-3 を介して作用することが明らかになった。一方、VEGF-D は増殖よりも遊走能に大きく関与し、その作用は VEGFR-3 のみならず integrin $\alpha 9$ を介することが明らかとなった。VEGFR-3 と VEGF-A、-C、-D の結合ならびに VEGF-D と integrin $\alpha 9$ の結合を阻害する薬剤は LAM におけるリンパ管新生を阻害し病態進展を抑制する新規治療薬になる可能性がある。

E. 結論

LAM 病巣中の LECs は VEGFR-3 と integrin $\alpha 9$ の発現を増強させ、LAM 細胞から産生される VEGF-D 刺激を受け、VEGF-D/VEGFR-3 シグナル伝達と VEGF-D/ integrin $\alpha 9$ シグナル伝達の両者を介しリンパ管新生が誘導されていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文

Nishino K, Yoshimatsu Y, Muramatsu T, Sekimoto Y, Mitani K, Kobayashi E, Okamoto S, Ebana H, Okada Y, Kurihara M, Suzuki K, Inazawa J, Takahashi K, Watabe T, Seyama K. Isolation and characterisation of lymphatic endothelial cells from lung tissues affected by lymphangioliomyomatosis. *Sci Rep.* 2021;11(1):8406.



OPEN

Isolation and characterisation of lymphatic endothelial cells from lung tissues affected by lymphangioleiomyomatosis

Koichi Nishino^{1,2✉}, Yasuhiro Yoshimatsu^{3,4}, Tomoki Muramatsu⁵, Yasuhito Sekimoto^{1,2}, Keiko Mitani^{1,2}, Etsuko Kobayashi^{1,2}, Shouichi Okamoto^{1,2}, Hiroki Ebana^{1,2,6,7}, Yoshinori Okada⁸, Masatoshi Kurihara^{2,6}, Kenji Suzuki⁹, Johji Inazawa⁵, Kazuhisa Takahashi¹, Tetsuro Watabe³ & Kuniaki Seyama^{1,2}

Lymphangioleiomyomatosis (LAM) is a rare pulmonary disease characterised by the proliferation of smooth muscle-like cells (LAM cells), and an abundance of lymphatic vessels in LAM lesions. Studies reported that vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) secreted by LAM cells contributes to LAM-associated lymphangiogenesis, however, the precise mechanisms of lymphangiogenesis and characteristics of lymphatic endothelial cells (LECs) in LAM lesions have not yet been elucidated. In this study, human primary-cultured LECs were obtained both from LAM-affected lung tissues (LAM-LECs) and normal lung tissues (control LECs) using fluorescence-activated cell sorting (FACS). We found that LAM-LECs had significantly higher ability of proliferation and migration compared to control LECs. VEGF-D significantly promoted migration of LECs but not proliferation of LECs in vitro. cDNA microarray and FACS analysis revealed the expression of vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)-3 and integrin $\alpha 9$ were elevated in LAM-LECs. Inhibition of VEGFR-3 suppressed proliferation and migration of LECs, and blockade of integrin $\alpha 9$ reduced VEGF-D-induced migration of LECs. Our data uncovered the distinct features of LAM-associated LECs, increased proliferation and migration, which may be due to higher expression of VEGFR-3 and integrin $\alpha 9$. Furthermore, we also found VEGF-D/VEGFR-3 and VEGF-D/ integrin $\alpha 9$ signaling play an important role in LAM-associated lymphangiogenesis.

Lymphangioleiomyomatosis (LAM) is a rare lung disease that typically affects women of childbearing age, and is characterised by the proliferation of abnormal smooth muscle-like cells (LAM cells) which leads to diffuse cystic destruction of the lungs. LAM cells are low-grade metastasizing neoplasms harboring mutations in either the *TSC1* or *TSC2* gene, tumor suppressor genes encoding hamartin or tuberin, respectively. *TSC1* or *TSC2* mutations results in dysregulated mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) signaling in LAM cells¹.

As expressed in the name of disease, lymphangiogenesis is the conspicuous pathological feature of LAM. LAM lesions in the lungs as well as retroperitoneal lymphangioleiomyomas, have abundant lymphatic vessels with irregularly dilated spaces or slit-like appearance together with proliferating LAM cells^{2,3}. Corresponding with these pathological findings, LAM patients frequently develop lymphatic manifestations including chylous fluid accumulation in the pleural and/or peritoneal spaces, pulmonary lymphatic congestion, and lower extremity

shino@juntendo.ac.jp

